

## Cara uji mikrobiologi - Bagian 10 : Penentuan *Vibrio vulnificus* pada produk perikanan





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan .....	2
5 Media dan pereaksi .....	2
6 Kondisi pengujian .....	3
7 Penyiapan contoh.....	3
8 Prosedur .....	3
9 Interpretasi hasil .....	6
10 Pelaporan hasil .....	6
11 Keamanan dan keselamatan kerja .....	7
Lampiran A .....	8
Lampiran B .....	11
Lampiran C .....	14
Lampiran D .....	17
Bibliografi.....	18
Tabel 1 - Berat contoh yang diambil yang akan diuji.....	3
Tabel 2 - Karakteristik biokimia <i>vibrionaceae</i> yang terdapat pada makanan laut.....	6
Tabel A.1 - Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% .....	10
Gambar D.1 - Skema penentuan <i>Vibrio vulnificus</i> .....	17



## **Prakata**

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas produk perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan di luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan, yang telah dirumuskan melalui rapat teknis, dan rapat konsensus pada tanggal 21 Oktober 2014 di Jakarta dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.019/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 15 Januari 2015 sampai dengan 16 Maret 2015 dengan hasil akhir RASNI.





## Cara uji mikrobiologi – Bagian 10: Penentuan *Vibrio vulnificus* pada produk perikanan

### 1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk mendeteksi, mengisolasi dan mengonfirmasi bakteri *Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*) pada produk perikanan.

### 2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini digunakan.

#### 2.1

##### **inkubasi**

pengkondisian mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

#### 2.2

##### **koloni terduga**

koloni-koloni yang tumbuh pada media agar selektif dan memberikan ciri-ciri *V. vulnificus* yang khas. Koloni-koloni ini perlu dikonfirmasi untuk meyakinkan benar tidaknya *V. vulnificus*

#### 2.3

##### **media pengayaan**

media yang digunakan untuk memperbaiki sel-sel bakteri yang rusak atau meningkatkan jumlah populasi bakteri

#### 2.4

##### **media selektif**

media yang mengandung bahan-bahan selektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri selain bakteri yang diuji

#### 2.5

##### **media agar**

media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme

#### 2.6

##### **produk perikanan**

ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir yang berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

#### 2.7

##### **bakteri halofilik**

bakteri yang dapat hidup pada konsentrasi garam tinggi

#### 2.8

##### ***Vibrio vulnificus***

bakteri yang ditemukan secara alami di daerah perairan hangat, termasuk dalam genus *Vibrio* sp, Gram-negatif, berbentuk batang atau batang melengkung bersifat anaerob fakultatif, oksidase positif, serta dapat memanfaatkan laktosa



### 3 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengayaan dan dideteksi dengan menumbuhkan pada media agar selektif. Koloni yang diduga *V. vulnificus* pada media agar selektif diisolasi dan dikonfirmasi melalui uji biokimia untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *V. vulnificus*.

### 4 Peralatan

- blender beserta jar yang dapat disterilisasi atau stomacher beserta plastik steril;
- cawan petri ukuran 15 mm x 100 mm;
- tabung reaksi ukuran 16 mm x 125 mm dan ukuran 13 mm x 100 mm;
- tabung tertutup ukuran 16 mm x 150 mm;
- timbangan analitik dengan ketelitian 0.01 g dan 0.0001 g;
- inkubator 35 °C ± 2 °C;
- waterbath 42 °C ± 0.2 °C;
- autoclave 121 °C;
- jarum Ose dan jarum inokulasi;
- bunsen;
- hotplate dilengkapi dengan magnetik stirrer;
- alat pengocok (*vortek mixer*);
- peralatan sterilisasi;
- oven;
- mikroskop;
- pipet atau pipetor 1 mL, 5 mL, 10 mL.

### 5 Media dan pereaksi

- *alkali pepton water* (APW) (B.1);
- *decarboxylase* basal medium dengan penambahan suplemen arginin, lysine dan ornithine secara individual (B.2);
- *MR-VP broth* (B.3);
- *thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose* (TCBS) agar (B.4);
- *trypticase (tryptic) soy agar* (TSA) (B.5);
- *trypticase (tryptic) soy broth* (TSB) (B.6)
- *tryptone broth* (T1N0, T1N1, T1N3, T1N6, T1N8, T1N10) (B.7);
- *urea broth* (B.8);
- pereaksi kovacs (C.1);
- mineral atau Parafin Oil Steril (C.2);
- O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine) disk, 10 µg dan 150 µg (C.3);
- ONPG disk (C.4);
- pereaksi oksidase (C.5);
- HCl 1 N (C.6);
- NaCl 2 % (C.7);
- NaOH 1 N (C.8);
- pereaksi VP (C.9);
- *phosphate buffered saline* (PBS) (C.10);
- *physiological saline* 0.85 % (C.11);
- baku pembanding *Vibrio vulnificus*.

**CATATAN:** Pembuatan media diuraikan dalam Lampiran B dan pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran C.



## 6 Kondisi pengujian

Selama melakukan pengujian, terapkan teknis aseptis dan lakukan pengujian di ruangan atau *laminar air flow* yang terkontrol.

## 7 Penyiapan contoh

Dengan menerapkan teknis aseptis, contoh diambil secara acak dan dipotong kecil-kecil hingga berat masing-masing contoh yang akan diuji sesuai dengan ketentuan pada Tabel 1. Contoh beku dilelehkan pada saat akan dianalisa dan pelelehan dilakukan selama 18 jam pada suhu sekitar 2 °C – 5 °C atau suhu di bawah 45 °C dan tidak lebih dari 15 menit.

**Tabel 1 - Berat contoh yang diambil yang akan diuji**

Berat contoh	Berat contoh yang akan diuji
< 1 kg atau 1 L	100 g atau 100 mL
1 kg atau 1 L – 4,5 kg atau 4,5 L	300 g atau 300 mL
> 4,5 kg atau 4,5 L	500 g atau 500 mL

## 8 Prosedur

### 8.1 Persiapan pengujian

- Untuk contoh dengan berat Lebih kecil atau sama dengan 1 kg atau 1 L sampai dengan 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 25 g atau contoh cair sebanyak 25 mL dari contoh yang akan diuji, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 225 mL larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS).
- Untuk contoh dengan berat lebih besar dari 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 50 g atau contoh cair sebanyak 50 mL, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 450 mL larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS).
- Untuk kekerangan, siapkan 200 gram cairan dan daging kekerangan yang berasal dari 10 – 12 kekerangan. Masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 200 mL Larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS).
- Homogenkan selama 2 menit. *Homogenat* ini merupakan larutan dengan pengenceran  $10^{-1}$ .

### 8.2 Pengayaan

- Siapkan seri pengenceran  $10^{-2}$  dengan cara melarutkan 1 mL larutan  $10^{-1}$  ke dalam 9 mL PBS. Lakukan pengenceran yang lebih tinggi sesuai dengan pendugaan kepadatan populasi contoh. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali.
- Dengan menggunakan pipet steril pindahkan sebanyak 1 mL dari setiap pengenceran ke dalam 3 tabung pengenceran yang berisi 10 mL *Alkaline Peptone Water* (APW).
- Inkubasi tabung-tabung tersebut pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 - 24 jam.

### 8.3 Isolasi *Vibrio vulnificus*

- Ambil 1 Ose (diameter 3 mm) penuh dari setiap tabung yang positif (keruh) pada setiap pengenceran sedalam 1 cm dari permukaan cairan dan goreskan ke dalam TCBS agar. Inkubasi pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam - 24 jam.
- Amati keberadaan *V. vulnificus* pada TCBS agar. Koloni berbentuk bulat, datar, buram, hijau, diameter 1 - 2 mm.



## 8.4 Pemurnian

Ambil 3 atau lebih koloni yang khas (*typical*) atau yang diduga *V. vulnificus* dari TCBS agar lalu goreskan ke dalam TSA+2% NaCl (miring) dan TSI. Inkubasi pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 12 jam - 24 jam. Kultur pada media ini digunakan untuk analisa biokimia.

## 8.5 Uji biokimia pendahuluan

### 8.5.1 Uji oksidase

Goreskan 1 ose dari TSA+2% NaCl (miring) atau medium lain yang tidak memfermentasi karbohidrat ke dalam cawan petri yang berisi TSA. Inkubasi pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam - 24 jam. Teteskan 2 tetes - 3 tetes pereaksi *oksidase* pada koloni bakteri dan amati reaksinya. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua pada koloni. Uji *oksidase* dapat juga dilakukan dengan menggunakan kertas *oksidase* dengan cara menggoreskan koloni dari TSA miring ke atas permukaan kertas *oksidase* menggunakan tusuk gigi (jangan menggunakan ose yang terbuat dari nikel atau krom). Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua secara cepat.

### 8.5.2 Uji sensitifitas terhadap 0/129 vibriostat

Goreskan 1 ose dengan rapat dari TSA+2% NaCl (miring) ke dalam cawan petri yang berisi TSA. Letakkan *disk* 0/129 10 µg dan 150 µg pada goresan yang paling rapat dan inkubasikan pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam - 24 jam. Amati pertumbuhan disekitar *disk*. Reaksi sensitif ditunjukkan dengan terbentuknya zona disekitar *disk* (S), sedangkan reaksi resisten ditandai dengan adanya pertumbuhan disekeliling *disk* (R). *V. vulnificus* sensitif terhadap 0/129 10 µg dan 150 µg.

### 8.5.3 Uji ONPG

Untuk uji ONPG gunakan kultur dari TSI atau media lain yang mengandung *lactose*. Inokulasikan 1 ose kultur dari TSI ke dalam tabung yang berisi 0.5 ml larutan *Physiological Saline*. Masukkan 1 *disk* ONPG lalu inkubasikan pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit sampai dengan 1 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning pada media dalam tabung.

## 8.6 Uji Biokimia lanjutan

Lanjutkan pengujian apabila pada uji biokimia pendahuluan di atas ditemukan reaksi *V. vulnificus* yang khas. Goreskan kembali kultur dari TSA+2% NaCl (miring) ke TSA miring dan TSB. Inkubasikan pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam - 24 jam.

### 8.6.1 Uji Arginin *dihydrolase*, *Lysine dekarboksilase* dan *Ornithin dekarboksilase*

Inokulasikan kultur dari TSA miring ke dalam 3 tabung media dasar *dekarboksilase* yang masing-masing mengandung *arginin*, *lysin* dan *ornithin* serta ke dalam 1 tabung kontrol media dasar *dekarboksilase* yang tidak mengandung asam amino. Tambahkan masing-masing tabung dengan mineral oil steril setinggi 1 cm - 2 cm. Inkubasikan pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 4 hari. Lakukan pengamatan setiap hari. Reaksi *dekarboksilase* terhadap *asam amino* menghasilkan pH alkaline mengubah media menjadi ungu cerah (reaksi positif). Sedangkan reaksi fermentasi glukosa menghasilkan asam dan mengubah media menjadi warna kuning (reaksi negatif). *V. vulnificus* menghasilkan reaksi negatif pada arginin, sedangkan pada media lysin dan ornithin menghasilkan reaksi positif.



### 8.6.2 Uji toleransi terhadap garam

Inokulasikan kultur dari TSB ke dalam masing-masing *Tryptone Broth* 1 % yang mengandung 0 %, 1 %, 3 %, 6 %, 8 %, 10 % NaCl ( $T_1N_0$ ,  $T_1N_1$ ,  $T_1N_3$ ,  $T_1N_6$ ,  $T_1N_8$ ,  $T_1N_{10}$ ). Inkubasikan pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam – 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan. *V. vulnificus* tidak tumbuh dalam media  $T_1N_0$  dan  $T_1N_8$ ,  $T_1N_{10}$  (Tabel 2).

### 8.6.3 Uji pertumbuhan pada suhu 42 °C

Inokulasikan 1 ose dari TSB yang telah diinkubasikan selama 24 jam ke dalam TSB yang telah dihangatkan dalam *waterbath* 42 °C. Inkubasikan pada suhu 42 °C dalam *waterbath* selama 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan. *V. vulnificus* mampu tumbuh pada suhu 42 °C (Tabel 2).

### 8.6.4 Uji Voges-Proskauer

Inokulasikan 1 ose dari TSA miring ke dalam MR-VP *Broth*. Inkubasikan pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 2 hari. Pindahkan 1 mL dari setiap MR-VP *Broth* yang menunjukkan pertumbuhan ke dalam tabung reaksi steril ukuran 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0.6 mL larutan *alphannaphthol* dan 0.2 mL KOH 40 % lalu kocok. Tambahkan sedikit kristal kreatin untuk mempercepat reaksi. Kocok kembali dan diamkan selama 2 jam. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah muda sampai mirah delima (ruby) pada media. *V. vulnificus* menghasilkan reaksi VP negatif.

### 8.6.5 Uji Fermentasi Karbohidrat

Inokulasikan 1 ose dari TSA (miring) ke dalam masing-masing satu tabung *purple broth base* yang mengandung *sucrose*, *lactose*, *arabinosa*, *D- mannosa*, dan *D-mannitol*. Tambahkan masing-masing tabung dengan mineral *oil* steril setinggi 1 cm - 2 cm. Inkubasikan pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 4 hari - 5 hari dan lakukan pengamatan setiap hari. Reaksi positif fermentasi karbohidrat menghasilkan asam dan mengubah media menjadi kuning (Tabel 2).

### 8.6.6 Uji hidrolisis urea

Inokulasikan 1 ose dari TSA (miring) ke dalam media urea. Inkubasikan pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam. Strain *V. vulnificus* tidak mempunyai kemampuan dalam menghidrolisis urea.

### 8.6.7 Uji Hidrolisis gelatin

Inokulasikan 1 ose dari TSA (miring) ke dalam media. Inkubasikan media gelatin pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Strain *V. vulnificus* mempunyai kemampuan dalam menghidrolisis gelatin.



## 9 Interpretasi hasil

**Tabel 2 - Karakteristik biokimia *vibrionaceae* yang terdapat pada makanan laut**

		<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.cholera</i>	<i>V.fluialis</i>	<i>V.furnissii</i>	<i>V.hollisae</i>	<i>v.metschnikovii</i>	<i>V.mimicus</i>	<i>V.parahemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>
TCBS agar		K	K	K	K	H	K	H	H	H
mCPC agar		NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	K
<i>Arginin dihydrolase</i>		-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Ornithin decarboxylase</i>		+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Lysin decarboxylase</i>		+	+	-	-	-	+	+	+	+
Pertumbuhan	0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6% NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	+
	8% NaCl	+	-	V	+	-	V	-	+	-
	10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan pada suhu 42°C		+	+	V	-	TD	V	+	+	+
Asam dari	Sucrose	+	+	+	+	-	+	-	-	-
	D-cellobiose	-	-	+	-	-	-	-	V	+
	Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Arabinose	-	-	+	+	+	-	-	+	-
	D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	V
Oxidase		+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG		-	+	+	+	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer		+	V	-	-	-	+	-	-	-
Sensitifitas	10 µg 0/129	R	S	R	R	TD	S	S	R	S
	150 µg 0/129	S	S	S	S	TD	S	S	S	S
Urease		-	+	+	-	V	-	-	V	-
<b>Keterangan:</b> TCBS : <i>Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose</i> mCPC agar : Modified Cellobiose-Polymyxin B-Colistin Agar P: Ungu K : Kuning H : Hijau S : Sensitif R : Resisten V : Variabel TD : Tidak dilakukan NG : Tidak ada pertumbuhan										

## 10 Pelaporan hasil

Laporan hasil *V.vulnificus* menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan angka *V. vulnificus* sebagai APM/g.



## 11 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan pengujian maka dilakukan hal-hal sebagai berikut:

- a) Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan pengujian.
- b) Gunakan jas lab selama melakukan pengujian.
- c) Lakukan pengujian di dalam laminar *air flow*.
- d) Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan pengujian.
- e) Bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan.
- f) Media dan isolat bakteri yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang.





**Lampiran A**  
(normatif)  
**Angka Paling Memungkinkan/APM dengan seri tabung pengenceran**

**A.1 Latar belakang**

Metode untuk menduga jumlah bakteri dalam suatu produk, dapat menggunakan metode hitungan mikroskopis, metode hitungan cawan dan penentuan Angka Paling Memungkinkan (APM). Organisme yang mati maupun hidup dapat dihitung dengan metode hitungan mikroskopis, akan tetapi pada APM hanya organisme hidup yang dihitung.

Metode APM adalah metode untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan *medium* cair dalam tabung reaksi yang pada umumnya setiap pengenceran menggunakan 3 seri tabung dan penghitungan yang dilakukan merupakan tahap pendekatan secara statistik. Tabung positif ditunjukkan oleh adanya pertumbuhan bakteri dan gas. Nilai APM ini diperoleh dengan anggapan sebagai berikut:

- a) Bakteri dalam contoh menyebar secara random
- b) Bakteri dalam contoh tidak berkelompok atau kluster, tetapi saling terpisah
- c) Organisme yang terdapat dalam contoh dapat tumbuh dalam medium selama inkubasi
- d) Kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan, seperti media dan waktu inkubasi

Di dalam penggunaan seri tabung pengenceran tingkat pengenceran yang diperlukan didasarkan pada pendugaan populasi bakteri yang ada dalam contoh. Hasil yang baik adalah jika ada pengenceran yang lebih rendah contoh yang diduga lebih banyak menunjukkan hasil uji positif (adanya pertumbuhan bakteri) dan pada pengenceran lebih tinggi contoh yang diduga lebih sedikit menunjukkan hasil uji negatif (tidak ada pertumbuhan bakteri). Oleh karena itu, jumlah populasi bakteri yang ada dalam contoh diduga tinggi maka contoh diencerkan sampai diperoleh tingkat pengenceran yang lebih tinggi sehingga nilai APM maksimum yang dapat dihitung. Metode pengenceran yang paling mudah adalah dengan melakukan pengenceran 10 kali lipat dengan menggunakan 3 seri tabung pengenceran.

Metode APM digunakan untuk menduga organisme dalam jumlah sedikit (kurang dari 100/g) terutama susu, air dan makanan yang mempunyai partikel-partikel lain yang mungkin mengganggu keakuratan perhitungan. Kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh cukup untuk memberikan hasil yang signifikan dan umumnya terdapat dalam Tabel APM, sedangkan kombinasi yang tidak mungkin diabaikan. Tabel APM mempunyai tingkat kepercayaan 95%. Jika kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh tidak termasuk dalam tabel APM maka contoh yang asli dilakukan pengujian kembali. Dan jika ini tidak dapat dilakukan, maka analisis membandingkan dengan tabel APM yang lain untuk menghitung nilai APM berdasarkan hasil yang diperoleh.

**A.2 Cara pemilihan kombinasi tabung positif pada 3 seri tabung pengenceran dalam tabung APM**

Penentuan APM dihitung berdasarkan jumlah seri tabung positif pada beberapa pengenceran yang digunakan yang didasarkan pada 3 seri tabung pengenceran yang digunakan. Kombinasi yang diambil adalah 3 tingkat pengenceran dengan kaidah sebagai berikut:



**Kasus 1 Seluruh tabung pada seri tabung pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , dst) menunjukkan reaksi positif**

- Pilih tingkat pengenceran tertinggi yang menghasilkan seluruh tabung positif dan 2 pengenceran berikutnya, seperti contoh a dan b (Tabel A.1).
- Jika pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif (tingkat pengenceran  $10^3$  menghasilkan 1 tabung positif), maka tingkat pengenceran tersebut tingkat pengenceran tertinggi yang dipilih, seperti pada contoh c (Tabel A.1).
- Jika pada tingkat pengenceran tertentu menghasilkan tabung negatif (tingkat pengenceran  $10^3$ ) tetapi tingkat pengenceran berikutnya menghasilkan tabung positif (tingkat pengenceran  $10^4$  menghasilkan 1 tabung positif), maka yang dinyatakan tabung positif adalah tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh d (Tabel A.1).
- Jika pada tingkat pengenceran tertinggi ( $10^4$ ) masih terdapat tabung positif, maka pilih tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh e (Tabel A.1).

**Kasus 2 Tidak ada satupun dari seri pengenceran yang menghasilkan seluruh tabung positif**

- Lihat pada contoh f (Tabel A), jika tingkat pengenceran tertentu menghasilkan tabung positif ( $10^2$ ), maka pilih 2 tingkat pengenceran sebelumnya.
- Jika pada pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif (pengenceran  $10^3$  menghasilkan 1 tabung positif), maka tambahkan tabung positif tersebut ke tingkat pengenceran sebelumnya seperti pada contoh g (Tabel A.1).



**Tabel A.1 - Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran 0.1, 0.01 dan 0.001**

Pos. tubes			APM/g	Conf. lim.		Pos. tubes			APM/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	

**Sumber :** Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions, October 2010



**Lampiran B**  
(normatif)  
**Pembuatan media**

**B.1 Alkali Peptone Water (APW)**

- Peptone 10 g
- NaCl 10 g
- Aquades 1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades dan panaskan perlahan lahan. Pipet sebanyak 10 mL ke dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir  $8.5 \pm 0.2$ .

**B.2 Decarboxylase Basal medium (Arginin, Lysine, Ornithin)**

- Broth base
- Gelysate atau Peptone 5 g
- Yeast extract 3 g
- Glucose 1 g
- L-lysine 5 g
- Bromcresol Purple 0.02 g
- Aquades 1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades, panaskan perlahan hingga larut. Untuk arginin *Broth*, tambahkan 5 g L-arginin ke dalam 1 liter *Broth Base*. Untuk *lysine Broth* tambahkan 5 g *lysine* ke dalam 1 liter *Broth Base*, tambahkan 5 g L-ornithin ke dalam 1 liter *Broth Base*. Pipet sebanyak 5 ml dari masing-masing larutan asam amino lalu masukkan dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir  $8.5 \pm 0.2$ . Untuk control gunakan *Base* yang tidak diberi suplemen.

**B.3 MR-VP Broth**Medium 1

- Buffered Peptone-water powder 7 g
- Glucose 5 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g
- Aquades 1 liter

Medium 2

- Pancreatic digest of casein 3.5 g
- Peptic digest of animal tissue 3.5 g
- Dextrose 5 g
- Pottasium Phospate 5 g
- Aquades 1 liter



Larutkan bahan-bahan dalam aquades, panaskan. Tuang sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi dan sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. pH akhir 6.9 ± 0.2.

#### B.4 Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) agar

- Yeast extract      5 g
- Peptone      10 g
- Sucrose      20 g
- Sodiumthiosulfate 5 H<sub>2</sub>O      10 g
- Sodiumcitrate 2H<sub>2</sub>O      10 g
- Sodium cholate      3 g
- Oxgall      5 g
- NaCl      10 g
- Ferric citrate      1 g
- Bromthymol Blue      0.04 g
- Thymolblue      0.04 g
- Agar      15 g
- Aquades      1 Liter

Siapkan labu Erlenmeyer yang berukuran lebih besar dari volume media yang akan dibuat. Larutkan seluruh bahan dalam aquades hangat dan panaskan hingga larut. Setelah mendidih cepat angkat. Jangan di *autoclave*. Dinginkan hingga suhu 50 °C dan tuang ke dalam cawan petri steril. Keringkan cawan petri tersebut selama 1 malam atau pada suhu 37 °C - 45 °C sebelum digunakan.

#### B.5 Trypticase (tryptic) Soy Agar

Trypticase Peptone	15 g
Tryptone Peptone	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Aquades	1 Liter

Larutkan semua bahan dan didihkan. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. pH akhir 7.3 ± 0.2

#### B.6 Tryptic Soy Broth

- Tryptone atau Trypticase      10 g
- Aquadest      1 liter

Larutkan semua bahan dan pindahkan sebanyak 5 mL tabung reaksi. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, pH akhir 6.9 ± 0.2.

#### B7 Tryptone Broth dan Tryptone Salt Broth (T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>N<sub>3</sub>, T<sub>1</sub>N<sub>6</sub>, T<sub>1</sub>N<sub>8</sub>, T<sub>1</sub>N<sub>10</sub>)

- Trypticase atau Tryptone      10 g
- NaCl      0 g, 10 g, 30 g, 60 g, 80 g, 100 g
- Aquades      1 Liter



Larutkan semua bahan dalam aquades. Untuk  $T_1N_0$  tanpa penambahan NaCl, untuk  $T_1N_1$  gunakan 10 g NaCl (1% w / v NaCl) dan seterusnya. Tuang ke dalam tabung bertutup ukuran 16 mm x 125 mm. Tutup rapat tabung untuk mempertahankan konsentrasi garam yang terdapat dalam larutan tersebut sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. pH akhir  $7.2 \pm 0.2$ .

**B8. Urea Broth**

- Urea 20 g
- Yeast extract 0.1 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  49.5 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  9.1 g
- Phenol red 0.01 gr
- Aquades 1 Liter

Larutkan semua bahan dalam 1 liter aquades. Jangan dipanaskan. Sterilisasi menggunakan membrane filter 0.45  $\mu\text{m}$ . Pindahkan 0,1 mL – 0.3 mL ke dalam tabung steril pH akhir  $6.8 \pm 0.2$ .





## Lampiran C (normatif) Pembuatan pereaksi

### C.1 Pereaksi Kovac's

- *P-Dimethylaminobenzaldehyde* 5 g
- *Amyl alcohol (normal)* 75 mL
- HCl (pekat) 25 mL

Larutkan *P-Dimethylaminobenzaldehyde* dalam *Amyl alcohol (normal)*. Tambahkan HCl perlahan-lahan. Simpan pada suhu 4 °C. Untuk uji indol tambahkan 0.2 mL – 0.3 mL reagen ke dalam 5 mL kultur *Tryptone Broth* yang diinkubasi 24 jam. Terbentuk cincin merah pada permukaan menunjukkan hasil yang positif.

### C 2 Mineral (Parafin) oil

Pereaksi ini tersedia secara komersial.

### C.3 O /129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil pteridine) disk, 10 µg dan 150 µg

Pereaksi ini tersedia secara komersial.

### C.4 Uji ONPG

Larutan *Monosodium Phospat* 1.0M pH 7

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.9 g
Aquades	45 mL
Larutan NaOH 30% (w/v)	3 mL

Larutkan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dalam aquades. Tambahkan larutan NaOH 30% dan atur pH menjadi 7. Tepatkan volume dengan aquades dan simpan dalam refrigerator (kira-kira 4 °C)

0.0133 M *o-Nitriphenyl-beta-D-galaktoside* (ONPG)

ONPG	80 mg
Aquades 37°C	15 mL
Larutan <i>Monosodium Phospat</i> 1.0M pH 7	5 mL

Larutkan ONPG dalam aquades 37 °C. Tambahkan larutan 1.0 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Larutan ini tidak berwarna. Simpan dalam refrigerator (kira-kira 4 °C). Sebelum digunakan panaskan sesuai kebutuhan larutan ONPG pada suhu 37 °C.



**C.5 Pereaksi oksidase**

- N,N,N,N- Tetramethyl-p-phenylenediamine2HCl 1 g
- Aquades 100 mL

Siapkan pereaksi dalam kondisi segar. Pereaksi ini dapat disimpan hingga 7 hari dalam botol gelas dalam refrigerator. Pereaksi ini juga tersedia dalam bentuk kertas *oksidase*.

**C.6 1N Hydrochlorid acid**

- HCl 89 mL
- Aquades untuk melarutkan hingga 1 Liter

**C.7 Larutan 2% NaCl atau 3 % NaCl**Larutan 2% NaCl

- NaCl 20 g
- Aquades 1 Liter

Larutan 3% NaCl

- NaCl 30 g
- Aquades 1 Liter

Larutkan bahan dalam aquades. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. pH akhir 7.0

**C 8. Larutan 1 N Sodium Hydroxide Solution**

- NaOH 40 g
- Aquades 100 mL

Larutkan NaOH dalam aquades.

**C 9. Pereaksi VP**Larutan 1

- *Alpha-naphtol* 5 g
- *Alcohol* (absolut) 100 mL

Larutan 2

- *Pottasium hydroxide* 40 g
- Aquades 100 mL

Uji VP. Pindahkan 1 mL kultur 48 jam ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 0.6 mL larutan 1 dan 0.2 mL larutan 2. Kocok setelah penambahan larutan. Untuk mempercepat reaksi tambahkan Kristal creatine ke dalam campuran larutan. Biarkan pada suhu ruang. Baca hasilnya setelah 4 jam. Pembentukan warna eosin pink menunjukkan hasil yang positif.



**C.10 Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4**

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.724 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.210 g
- NaCl 7.65 g
- Aquades 1 Liter

Larutkan bahan dalam aquades. sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. pH akhir 7.4.

**C.11 Larutan Physiological Saline 0.85%**

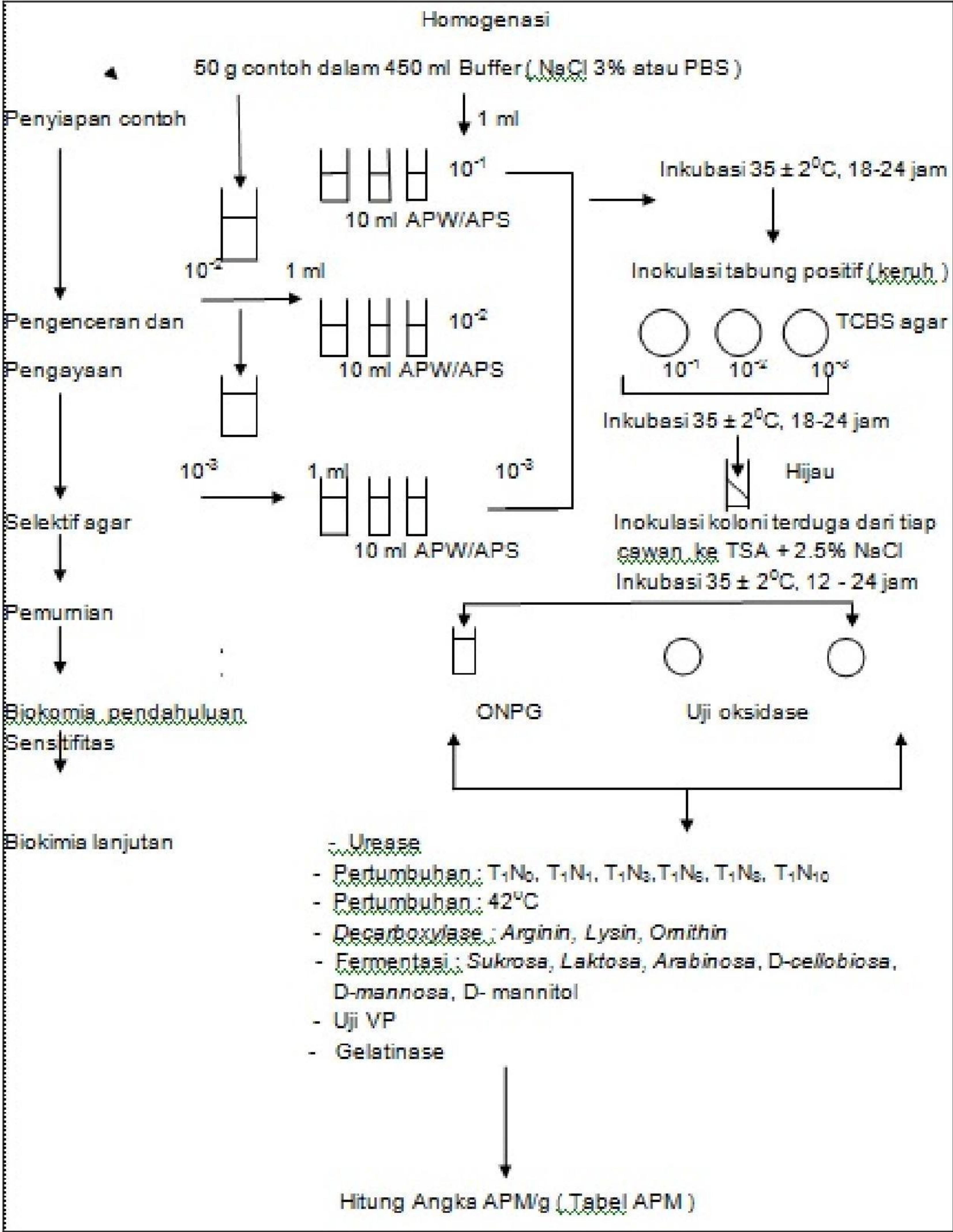
- NaCl 8.5 g
- Aquades 1 Liter

Larutkan 8.5 g NaCl dalam aquades. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.





Lampiran D  
(normatif)  
Skema penentuan *Vibrio vulnificus*



Gambar D.1 - Skema penentuan *Vibrio vulnificus*



## Bibliografi

*Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual. 8<sup>th</sup> Edition, Revision May 2004 Chapter 9.*

